

효모에서 SHC1 유전자의 이온 농도 조절에 의한 세포내 pH 항상성 유지

하승길 · 진준철 · 최의열*

한림대학교 유전공학과, 강원도 춘천시 옥천동, 200-702

출아효모는 주변 환경 pH의 커다란 변화속에서 적응할 수 있는 효과적인 체계를 지니고 있으며 SHC1 유전자는 알칼리 pH 조건에서 세포의 성장에 필요한 유전자 중에 하나임을 확인하였다. SHC1 유전자의 세포내 pH 조절 기작을 보다 구체적으로 알아보기 위하여 이 유전자가 소실된 돌연변이주를 제조하였다. 성장률의 차이가 나타나는 원인을 세포 내부의 pH 완충능력 결여에 의한 것으로 추측하고 pH 감수성 형광물질인 C.SNARF를 사용하여 외부 pH의 변화에 따른 세포 내부의 pH를 측정하였다. 알칼리 pH 완충효과는 소실 돌연변이의 경우는 야생 종 대비 70% 수준을 보였다. 또한 pH 조절에 관여하는 효모 세포 내부의 Na⁺과 K⁺의 농도를 원자흡광계를 사용하여 조사한 바, K⁺ 이온의 경우에는 돌연변이주에 비하여 야생형 세포내에 더 많이 존재하는 것으로 나타났으나 Na⁺ 이온의 경우는 별다른 차이점을 보이지 않았다. 이러한 결과는 K⁺ 이온의 조절이 효모에서 세포내 pH 조절 기작에 중요하며 SHC1 유전자는 이 K⁺ 이온의 세포내 농도 유지에 관여하고 있다는 것을 제시해 주었다.

Key words □ intracellular pH, ion content, transport, yeast

세포가 처해 있는 다양한 외부 조건 중에서 수소이온농도 즉 pH는 생명을 유지하기 위하여 반드시 조절되어야 하는 아주 중요한 인자의 하나이다. 세포 내 pH가 엄격하게 조절되어야 하는 이유로는, 먼저 조절한계 범위를 벗어나면 세포가 분열을 하지 않는다. 일례로 DNA 복제와 단백질 합성과정 전체가 수소이온 농도에 아주 민감하기 때문에 이들 복제 합성 기구들을 제대로 가동하기 위해서 안정적인 pH 조절이 필수적이다(12,17). 두번째로는, 세포내 효소의 반응속도는 pH에 의존한다. 해당작용에 관여하는 phosphofructokinase는 해당과정의 rate-limiting을 결정하는 주요소인데 생리적인 범위내의 아주 작은 수소농도 변화에도 활성도가 민감하게 반응한다(4). 일반적으로 생리적인 범위 내에서 pH가 높아지면 전체적인 신진대사율도 따라서 증가한다. 특히 K⁺ channel의 경우 세포내의 pH가 산성화되면서 K⁺ conductance가 급격히 떨어진다고 알려져 있다(13). 마찬가지로 Ca²⁺ channel과 세포와 세포간의 통신을 담당하는 gap junction의 기능도 pH의 변화에 민감하게 반응한다(19). 다음으로는 세포주기를 들 수 있는데, 세포주기와 세포분열의 조절에서 pH가 중요한 신호가 되기도 한다. 휴지기 세포내의 pH는 분열과정에 있는 세포내의 pH에 비하여 낮다. 이는 세포내 pH를 갑자기 증가시키면 G0/G1 시기에 있는 세포를 S시기로 전환되는 것으로 미루어 짐작할 수 있다. 엄격하게 조절되는 세포내 pH가 세포성장에서 2차 메센저의 역할도 한다(6,20). 이외에도 정자와 난자의 수정시에도 pH가 주요한 역할을 수행하고 있다.

선행연구에서 lacZ 유전자가 무작위적으로 삽입된 효모변이주

를 선별하는 방법을 사용하여 알칼리 조건에서 발현이 증가하는 변이주들을 골라내고 그 유전자를 확인하였다(3,8). 찾아진 두 종류의 유전자 중 SHC1으로 명명된 새로운 유전자는 1539개의 염기로 이루어져 있으며 예상되는 분자량은 56.5 kDa이다. 이 유전자는 세포벽의 키틴 합성에 관여할 것으로 추정되었으나 그 기능은 잘 알려져 있지 않다. 두 번째 유전자는 SCY1으로서 SHC1 유전자보다는 약간 큰 85 kDa로 마찬가지로 그 기능이 알려지지 않은 새로운 유전자이다. 현재 이들의 기능을 전통적인 유전자 분석법을 사용하여 알아본 결과 세포내 pH 조절에 관여하고 있다는 것을 확인하였다. 본 연구에서는 SHC1 유전자의 기능을 알아보기 위하여 null mutant를 제작하여 어떤 기작이나 경로를 통하여 효모 세포내 pH 조절이 이루어지고 있는가를 살펴보았다.

재료 및 방법

효모, 박테리아 및 배지

본 실험에 사용된 효모들은 다음과 같다(YC1, MAT α cry1/MAT α CRY ura3-52/ura3-52 leu2- Δ 98/leu2- Δ 98 HIS3/his3- Δ 200 TRP1/trp- Δ 1 SHC1/shc1::lacZ; YC2MAT α cry1/MAT α CRY ura3-52/ura3-52 leu2- Δ 98/leu2- Δ 98 HIS3/his3- Δ 200 TRP1/trp- Δ 1 SYC1/syc1::lacZ; YC3, MAT α cry1 CRY ura3-52 leu2- Δ 98 HIS3 trp- Δ 1 shc1::lacZ). 효모 성장 배지와 기본 조작을 위한 기술들은 Sherman등에 의해서 언급된 참고 자료를 이용하였다(18). *Escherichia coli*은 일반적인 LB 배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl을 2% agar를 이용하여 고형화)를 성장을 위하여 사용하였다. 사용된 항생제는 kanamycin (KM), chloram-

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 033-240-1465, Fax: 033-252-3420
E-mail: euchoi@hallym.ac.kr

phenicol (CM), streptomycin (SM), ampicillin (AP), spectinomycin (SP)로서 각각 최종 40, 30, 100, 100, 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 사용하였다.

돌연변이(Null mutant)의 제조

돌연변이체 제조는 중합효소연쇄반응 PCR을 이용한 방법을 적용하였다. *URA3* 유전자를 지닌 Shuttle vector pRS315를 주형으로 사용하여 증폭한 후 *URA3* 유전자 양 말단에 *SHC1* 유전자의 Open Reading Frame (ORF) 바로 바깥쪽에 해당하는 40개의 염기가 부착되도록 다시 증폭한 후 효모에 형질전환시키고 선별하였다. *SHC1* 완전 소실 돌연변이체를 만들기 위한 Primer의 서열은 다음과 같다. 5'-AGT ACT CCT TTG TTA AAA TCA GGC AGT ACC CAT AAG GCG CGT TTC GGT GAT GAC-3'과 5'-AAA ATA AAA GGA AGT TTG TAT TTA TCT AAG GGT GAT GGT TCA CGT AGT-3'. 형질전환 후 돌연변이체는 uracil 결핍배지에서 선별하였다. 선별 후 각각의 집락을 배양하여 게놈 DNA를 추출 후 *SHC1* 유전자의 Promoter 부분부터의 증폭이 가능한 다음과 같은 Primer를 이용한 PCR을 다음과 같은 방법에 의하여 진행하였다(PSCY1 아미노 말단 5'-TTC TTG CAA TTG TCT GTT AAC AAA TGC TGA TTC AC-3', 카복실 말단 5'-ATT GGC TAA TTC CTG TGA ATT GTA TAC GGA CT-3'). 증폭된 PCR 산물은 *SHC1* 유전자를 코딩하고 있던 부분이 상동재조합 과정에 의하여 *URA3* 유전자로 대체되어 있으므로, Apa I 제한효소 처리후 Ethidium Bromide를 이용한 염색과정을 거쳐 완전소실 돌연 변이주를 최종 확인하였다.

세포질 pH 측정

50 ml YPD 배지에 효모를 배양 후 mid log phase에서 3,000 $\times g$ 로 5 분간 원심분리하여 효모 세포를 모은 후 25 ml의 세척용액으로(30 mM MOPS, Tris로 적정, pH 6.0) 씻어준 다음 10 ml의 세척용액 Buffer로 현탁시켰다. C.SNARF-1-AM을 (Molecular probes, 최종 농도 10 μM) 준비된 10 ml의 세포 현탁액에 첨가 후 40 분간 실온에서 orbital shaker로(200 rpm) 배양 후 효모 세포를 20 ml의 세척용액으로 씻어 주었다. 10 ml 세척용액에 재현탁시킨 후 얼음에 보관하였다. 준비된 세포는 C.SNARF-1-AM 첨가 후 5 시간 내에 사용하였다. C.SNARF-1-AM를 첨가한 세포를(1-2 $\times 10^7$ cells/ml, 2 ml 총부피) excitation 534 nm, emission 580 nm에서 형광세기의 변화를 조사하여 각각의 효모 내부 pH 변화를 관찰하였다(7).

세포 내부 이온 측정

효모를 YPD 배지를 사용하여 660 nm 파장에서 흡광도 0.6-0.7까지 배양 후 1,900 $\times g$ 에서 5 분간 원심분리하였다. 알칼리가 처리된 YPD 배지에서 같은 농도로 30°C에서 배양 후 10 ml 씩 각각의 시간차를 두어 분주하여 1,900 $\times g$ 에서 5 분간 원심분리하였다. 동량의 차가운 세척용액(20 mM MgCl_2 , isoosmotic sorbitol)을 이용하여 재현탁한 후 원심 분리를 2 번 반복하였다. 세포 침전물을 1 ml의 세척용액으로 현탁한 후 원심 분리하고

0.5 ml의 20 mM MgCl_2 에 희석하였다. 이온의 추출은 95°C에서 15 분간 처리 후 원심 분리하고 표층액을 atomic absorption spectrometer를 이용하여 각각의 이온의 농도를 측정하였다(14).

초산 양 측정

1 $\times 10^8$ 효모를 비대사성 염기인 NaOH를 이용하여 pH 9.0으로 적정 후 5,000 $\times g$ 에서 5 분 동안 원심 분리후 상층액을 이용하여 제조사의 방법에 따라 초산분비량을 측정하였다(BOEHRINGER MANNHEIM, Germany). Acetyl-CoA synthase, citrate synthase, malate dehydrogenase 등의 효소를 이용하여 340 nm에서의 흡광도를 측정하여 다음과 같은 공식에 의하여 초산양을 측정 하였다($C = [V \times MW / \epsilon \times d \times v \times 1000] \times \Delta A [g/l]$).

결과 및 고찰

SHC1 완전 소실 변이주의 알칼리 환경에서 성장 저해

효모는 주변 pH의 커다란 변화속에서 적응할 수 있는 효과적인 체계를 지니고 있으며 *SHC1*은 알칼리 pH에서의 성장을 위하여 필요한 유전자 중에 하나임을 *LacZ* 삽입 돌연변이를 사용한 실험에서 확인하였다(8). 이 결과를 토대로 본 연구에서는 *SHC1* 완전 소실 돌연변이를 PCR 기법으로 제조하였다. *SHC1* 유전자의 소실의 확인은 마찬가지로 PCR 기법을 사용하였다 (data not shown). 또한 외부 알칼리 pH를 변화시키기 위하여 pH 8.5 50 mM HEPES, pH 9.5 50 mM CAPS, 그리고 pH 10.5 50 mM CAPSO 등의 다양한 완충용액을 사용하여 보았으며, NaOH를 사용한 실험과 유사한 결과를 보여 주었다. 이는 pH 적정에 사용된 화합물의 조성보다는 수소 이온 농도에 전적으로 의존적으로 돌연변이주의 성장이 저해된다는 것을 보여 주었다. *LacZ* 삽입 돌연변이와 마찬가지로 *SHC1* 완전 소실 돌연변이체에서 외부 pH에 의한 효모의 성장률을 비교하여 보았다(Fig. 1). 각각의 세포주 별로 pH 9.5 (최종 농도 50 mM CAPSO)로 적정한 YPD 액체 배지에 접종한 후 2 시간의 간격을 두고 배양하며

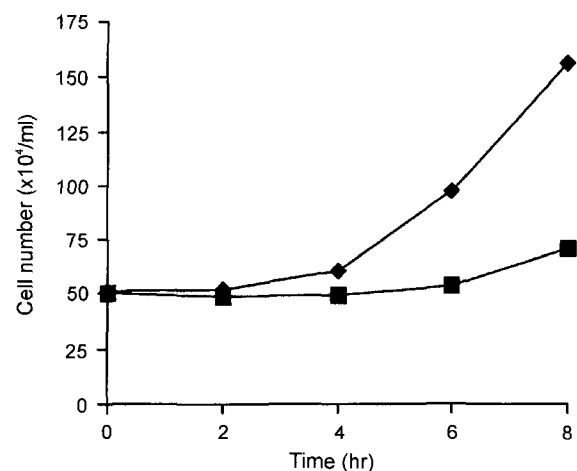


Fig. 1. Growth rate of *SHC1* deletion mutant at alkaline pH. Wild Type (\blacklozenge) Δshc1 null mutant (\blacksquare).

세포계산법을 이용하여 성장률을 측정하였다. 세포수의 측정 결과 야생형, 그리고 SHC1 완전 소실 돌연변이주에서 성장률의 차이가 나타남을 알 수 있었다. 이는 SHC1 유전자가 알카리 조건에서 세포의 성장에 관여한다는 것을 다시 한 번 확인하여 주었다.

알칼리 처리 후 세포 외부 pH 변화 양상

효모는 알칼리 pH 외부 환경조건에서 다양한 종류의 산성화 과정을 활용하여 알칼리 조건에 적응하는 것으로 알려져 있다. 이 변화를 알아보기 위하여 야생형과 삼입형 돌연변이주를 pH 9.5에서 접종한 후 시간별로 외부 배지 pH의 변화 정도를 확인하였다(8). 시간이 지남에 따라 야생형 효모의 외부 pH의 산성화를 확인할 수 있었다. 그렇지만 SHC1 유전자를 제거한 효모에서는 외부 pH의 산성화가 야생형에 비하여 현저하게 저해되고 있음을 알 수 있었다. 반면, 야생형 효모의 경우에는 4시간 정도 후에는 YPD 배지의 정상 pH를 회복하였다. 본 연구에서는 이런 차이점의 원인을 규명하기 위하여 효모에서 생산되어지는 산성 대사물 중 어떤 화합물에 의해서 산성화 정도의 차이가 발생하는지를 찾아보기 위해서 초산의 발생량을 측정하여 보았다. 외부 배지의 산성화 효율의 차이를 규명해내기 위하여 SHC1 완전 돌연변이체와 야생형 효모의 알칼리 외부 환경에서의 초산 생산량을 측정키트를 사용하여 알아보았다. 실험 결과 SHC1 돌연변이체의 경우 야생형에 비하여 초산의 분비량이 적음을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

효모에서 외부 pH의 조절, 특히 pH를 낮추는 부분에서 몇 개의 기작들이 예측되어져 왔다. 효모의 경우 알코올 발효과정 동안 초산이 부산물로서 생산되어진다. 포도주와 맥주의 발효동안 초산의 양은 리터 당 1-2g 정도 생산되어 진다. 알칼리 환경에서의 첫 번째로 나타나는 반응은 초산의 분비이며 Shc1 단백질은 이 과정에 관여할 것으로 예상된다. 이전의 실험에서 알칼리 화시킨 세포외부 배지의 산성화 속도가 SHC1 null mutant의 경

우 야생형에 비교하여 늦게 나타남을 확인할 수 있었다(8). *S. cerevisiae*의 경우에는 호기성, 혐기성 조건에 관계없이 호흡율이 특히 낮기 때문에 포도당 등의 이용에 의한 대사 에너지를 발효에 의하여 충족시킨다. 초산의 생산량이 많은 이유의 설명이 가능하기 위해서는 야생형의 경우에는 포도당을 이용한 발효율이 SHC1 null mutant보다 높다고 예상할 수 있다. 이를 뒷받침하는 또 하나의 결과로서 현재 실험에 사용되어지고 있는 효모의 경우에는 selection marker로서의 이용 가능성을 위하여 *URA3*, *ADE2*, *HIS3* 등의 여러 필수 유전자들의 점돌연변이화시킨 변이주들이 사용되어지고 있다. 실험에 사용되어진 SHC1 null mutant의 경우에는 야생형에 비하여 좀 더 붉은 색을 띠고 있음을 확인 하였다. *ADE2* 돌연변이주의 경우는 purine 합성 경로에서의 신호 전달 체계상에서 적색의 색소의 축적에 의해서 붉은 색을 띄게 되는데 호흡율이 높을수록 더욱 진한 붉은색을 띄게 된다. 이런 점에 비추어 SHC1 null mutant의 경우에는 야생형 효모의 일반적인 경우에서 예상되어지는 발효가 아닌 호흡을 이용한 에너지 대사를 하는 것으로 예상할 수 있다.

알칼리 조건에서 세포 내부 pH 변화

성장률을 측정한 결과 pH 8까지는 큰 차이를 보이지 않았으나 pH가 높아질수록 성장률의 감소가 일어났으며, 이러한 성장률의 차이가 나타나는 원인을 세포 내부의 pH 완충 작용의 결과에 의한 것으로 추측되었다. 이에 대한 확인을 위하여 pH의 차이에 의한 감수성을 보여 주는 형광물질인 C.SNARF를 사용하여 각각의 변이주 별로 pH의 변화에 따른 세포 내부의 pH를 측정하였다. 현재 세포 내부의 pH 측정을 위한 다양한 방법들 중 가장 간편하고 빠르게 세포 내부 pH의 변화를 측정할 수 있는 방법 중의 하나로서 형광 염색물질을 사용하여 pH를 측정하는 방법이다. 알칼리 pH 완충효과가 야생형 효모에서는 제대로 유지되는데 반하여 SHC1 소실 돌연변이의 경우 야생형 대비 70% 정도의 완충 효과를 보였다. 외부 pH에 대한 효모 세포 내

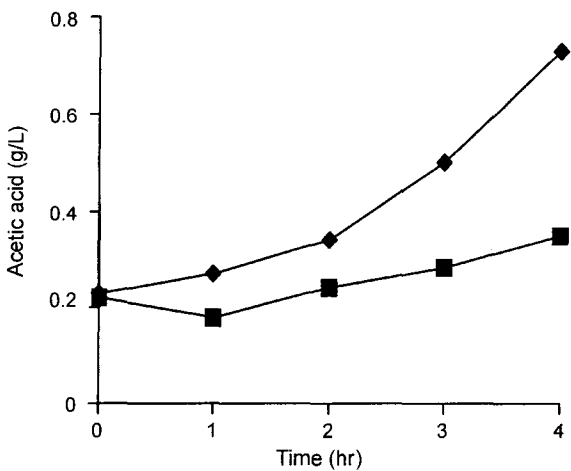


Fig. 2. Acidification of extracellular pH by production and secretion of acetic acid after alkali treatment. Wild Type (◆) Δshc1 null mutant (■).

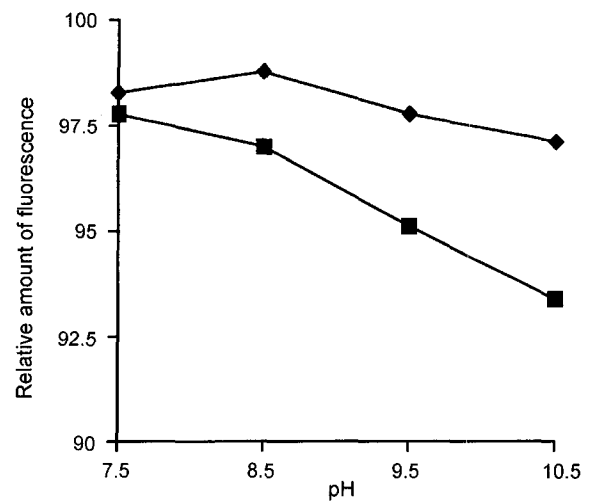


Fig. 3. Buffering effect of SHC1 gene in the regulation of intracellular pH against extracellular pH. Wild Type (◆) Δshc1 null mutant (■).

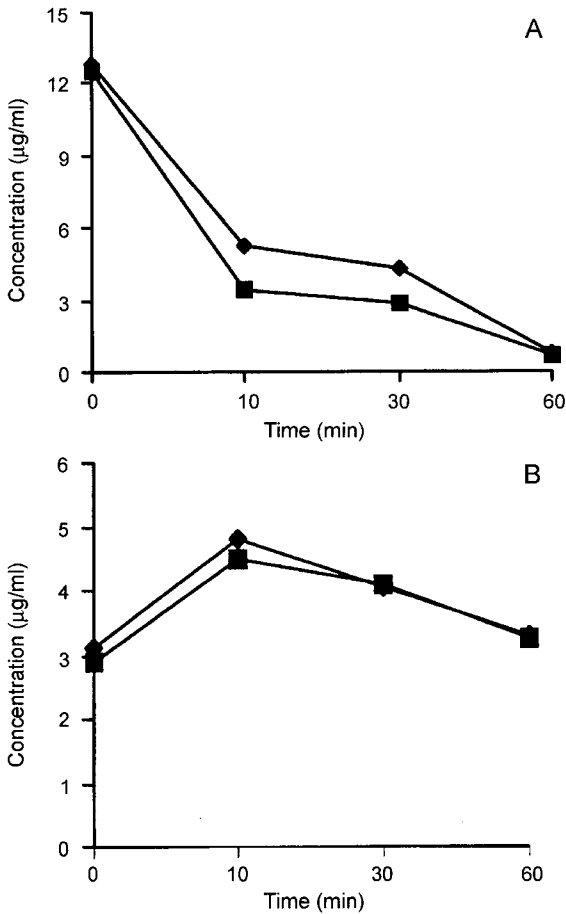


Fig. 4. Change in intracellular concentration of Na⁺ and K⁺ after alkali treatment. (A) K⁺, (B) Na⁺ Wild Type (◆) Δshc1 null mutant (■).

부의 pH 변화 및 중화 반응을 살펴보기 위한 실험에서 pH가 높아질수록 세포내부의 pH의 변화가 가장 적음을 알수 있었다 (Fig. 3).

세포 내부 이온 측정

세포내 pH의 조절 과정에 이온 펌프 및 수송체가 관여하는 것으로 연구 결과가 발표되어 있다. 특히 K⁺/H⁺ antiporter (KHA)와 Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) pH를 조절할 것으로 알려져 있다(1,2,21). 이들 펌프들이 알칼리 조건에서 pH를 조절할 것으로 예상된다(5,9). 이 중에서 KHA가 더욱 중요할 것으로 생각되는데, 이는 효모내의 K⁺의 농도가 Na⁺ 이온의 농도에 비하여 5-10 배 정도 높기 때문이다. 따라서 알칼리 조건에서 효모는 K⁺ 이온의 외부로의 방출과 H⁺ 이온의 유입을 통하여 세포내 pH를 낮출 것으로 예측된다. 이 가설을 증명하기 위하여 야생형 효모와 SHC1 소실 돌연변이를 알칼리에 처리한 후 시간별로 세포내 K⁺ 이온과 Na⁺이온의 농도를 측정 하였다. Na⁺의 농도는 NaOH 첨가 후에 지속적인 증가를 보이며 SHC1 소실 돌연변이와 야생형 사이의 차이점을 보이지 않았으나 K⁺의 경우에는 NaOH 첨가에 의한 배지의 알칼리화에 의해서 모두 감소하는 양상을 띄었으며, 감소량에서는 SHC1 소실 돌연변이의 경우에 20%정도

많은 양이 감소함을 확인하였다(Fig 4). 산성화에 관여하리라 예상되어지는 K⁺의 역할에 관하여 밝혀진 바에 따르면 외부 배지의 산성화를 위하여 K⁺의 방출이 일어나게 되며 이 원인은 H⁺ 이온에 대한 투과성의 증가에 따른 이차적인 효과에 기인한 것으로 보고 되고 있다. 그러나 이러한 실험들이 외부 pH가 알칼리 상황에서 이루어진 것이 아닌 산성 환경에서 이루어진 점이 본 연구에서 밝혀진 결과의 설명에 대하여 문제점을 제기하게 된다. 현재 예상하는 바로는 알칼리 환경에서는 외부로의 H⁺ 이온의 유출이 최소화 되리라고 예상하고 있으며 만약 이 가설이 맞는 경우라면 H⁺ 이온의 유출이 적어진 관계로 K⁺의 유출 역시 적어진다고 예상할 수 있다. 또한 이 가설을 뒷받침 하는 자료로서 세포내의 K⁺ 농도가 높을수록 포도당의 사용율이 높아지며 이는 발효와 초산의 생산량이 많아진다고 보고되었다(16).

효모의 알코올 발효 동안 아세트산이 부산물로서 생산되어진다. 포도주와 맥주의 발효 동안 초산의 양은 리터 당 1~2 g 정도 생산되어 진다. 알칼리 환경에서의 첫 번째로 나타나는 반응은 아세트산의 분비이며 Shc1 단백질은 이 과정에 관여할 것으로 예상된다. 두 번째는 효모의 세포막 H⁺-ATPase (PMA1)이 세포 내부의 pH에 유지에 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 포도당이 있는 상황에서 H⁺-ATPase가 활성화되고 외부 배지의 광범위한 산성화가 일어난다. 포도당에 의한 극적인 효과와 비슷하게 Shc1 단백질은 직접적 혹은 간접적으로 H⁺-ATPase를 조절하여 외부 pH를 낮출 것이다. 세 번째로 박테리아, 조류, 효모와 같은 미생물들은 어떤 특별한 상황에서 건량의 10~20%정도의 많은 양의 polyphosphate를 포함하고 있다(10,15). Polyphosphate의 역할로 추정되어 지는 한 가지는 세포 내부 pH의 완충 작용이다. Phosphate의 분해 작용이 알칼리 스트레스에 대한 보호기작으로서 작용할 것으로 예상된다(11).

감사의 말

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구 되었음(KRF-99-041-D00361 D4001)

참고문헌

- Alper, S.L. 1991. The band 3-related anion exchanger (AE) gene family. *Ann. Rev. Physiol.* 53, 549-564.
- Bock, J. and Marsh, J. 1988. Proton Passage across cell membrane. Willey, Chichester, UK.
- Burns N., B. Grimwade, P. B. Ross-Macdonal, E.Y. Choi, K. Finberg, G.S. Roeder, and M. Snyder. 1994. Large-scale analysis of gene expression, protein localization and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Develop.* 8, 1087-1105.
- Fidelman, M.L., S.H. Seeholzer, K.B. Walsh, and R.D. Moore. 1982. Intracellular pH mediates action of insulin on glycolysis in frog skeletal muscle. *A. J. Physiol.* 242, 87.
- Fliegel, L. and O. Frohlich. 1993. The Na⁺/H⁺ exchanger: An update on structure, regulation, and cardiac physiology. *Biochem. J.* 296, 273.
- Gerson, D. F. and A. C. Burton. 1977. The relations of cycling of

- intracellular pH to mitosis in the acellular slime mold *Phasarium polycephalum*. *J. Cell Physiol.* 91, 297-304.
7. Haworth, R.S. and L. Fligel. 1993. Intracellular pH in *Schizosaccharomyces pombe*-comparison with *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biochem.* 124, 131-140.
 8. Hong, S.K., S.B. Han, and E.Y. Choi. 1999. SHC1, a high pH inducible gene required for growth at alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 255, 116-122.
 9. Kopito, R.R. 1990. Molecular biology of the anion exchanger gene family. *Int. Rev. Cytol.* 123, 177-199.
 10. Kulaev, I.S., O. Szymona, and M.A. Bobyk. 1968. On the synthesis of inorganic polyphosphates in *Neurospora crassa*. *Biochimie* 33, 419-433.
 11. Ludwig, J.R., H.S.G. Oliver, and C.S. McLaughlin. 1977. The effect of amino acids on growth and phosphate metabolism in a prototrophic yeast strain. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 79, 16-23.
 12. Madshus, I.H. 1988. Regulation of internal pH in eukaryotic cells. *Biochem. J.* 250, 1-8.
 13. Moody, W.J. Jr. 1982. Intracellular pH: Its Measurement, Regulation, & Utilization in Cellular Functions (Niccitelli, R. & D.W. Deamer, eds.) pp. 427-433, Alan R. Liss, new York.
 14. Mulet, J.M., M.P. Leube, S.J. Kron, G. Rios, G.R. Fink, and R. Serano. 1999. A novel mechanism of iron homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transport. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3328-3337.
 15. Pick, U., M. Bental, E. Chitlaru, and M. Weiss, 1990. Polyphosphate hydrolysis-a protective mechanism against alkaline stress? *FEBS Lett.* 274, 15-18.
 16. Ramirez, J., O. Ramirez, C. Saches, R. Coria, and A. Pena. 1998. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K⁺/H⁺ exchanger. *J. Bac.* 180, 5860-5865.
 17. Roos, A. and Boron, W.F. 1981 Intracellular pH. *Physiol. Rev.* 61, 296-434.
 18. Sherman, F., G.R. Fink, and J.B. Hicks. 1986. Methods in yeast genetics: A laboratory manual. Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 19. Spray, D.C., J.H. Sternet, A.L. Harris, and M.V.L. Bennet. 1982. Gap junctional conductance: comparison of sensitivities to pH and Ca⁺⁺ ions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 441-445.
 20. Steinhardt, R.A. and M. Morisawa. 1982. Intracellular pH: Its Measurement, Regulation, & Utilization in Cellular Functions (Niccitelli, R. & D.W. Deamer, eds.) pp. 361-374, Alan R. Liss, new York.
 21. Thomas, R.C. 1989. Bicarbonate and pHi response. *Nature* 337, 601.

(Received July 29, 2002/Accepted September 9, 2002)

ABSTRACT: Regulation of Intracellular pH by SHC1 in *Saccharomyces cerevisiae*

Sung Gil Ha, Joon Cheol Jeon, and Eui Yul Choi* (Department of Genetic Engineering, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea)

Budding yeasts maintain an effective system to regulate intracellular pH in response to environmental pH fluctuation. In a previous study we reported that SHC1 plays a role in cell growth at alkaline condition, not at acid pH. We constructed a null mutant deleted an entire open reading frame for SHC1. To test whether the retardation in cell growth was caused by the absence of intracellular pH buffering capacity, we measured intracellular pH with a pH-sensitive fluorescent dye, C.SNARE. The intracellular pH of the mutant cell was much higher than that of wild-type cells, indicating that the mutant cells lack some types of buffering capacity. We also investigated the level of Na⁺ and K⁺ content with atomic mass spectroscopy after alkali shock. Wild-type cell showed a higher level of intracellular K⁺ content, whereas there was no difference in Na⁺ level. The result suggested that K⁺ is more important in the regulation of intracellular pH in yeasts.